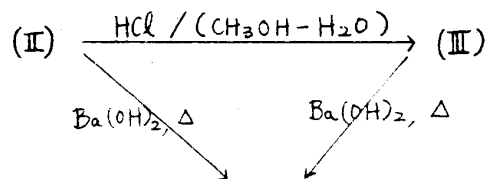


11. ウミホタルルシフェリンの構造について

名古屋大学理学部化学教室 岸義人, 後藤俊夫, 平田義正
 名古屋大学理学部水質科学研究施設 下村脩

ウミホタル (*Cypridina hildendorffii*) の生物発光についての研究は Harvey ら¹⁾ により古くから行われ、この発光系にはいわゆるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応があり、発光にはこの他酸素があれば十分であるのが明らかにされている。陸のホタルの発光²⁾ にはルシフェリン、ルシフェラーゼ、酸素の他に ATP、マグネシウムイオン等が必要であるのに比べれば、この系は最も簡単な発光系の一つであり発光機構の研究には適している。この様な目的で我々は第一段階としてウミホタルルシフェリン (以下ルシフェリンと略) の単離精製を試み、1957年にルシフェリンの結晶化に成功し、この化合物はインドール誘導体である³⁾ ことを明らかにした。ひきつづき構造研究をつづけ、1959年に一応の推定構造を提出し⁴⁾ が、発色系などの説明に難点が残った。また江口⁵⁾ はルシフェリンおよびその誘導体の加水分解で得られるアミノ酸をアミノ酸分析器で精密に分析したが、アミノ酸の生成が通常のペプチドのように定量的ではなくそれから構造を論ずることは困難であった。我々はさらに構造を確定するため研究をつづけた。特にルシフェリンの発光の際生ずるオキシルシフェリンから研究を始め、その知見をもとにしてルシフェリンの構造を明らかにする方針をとった。

酸素の存在のもとでルシフェリン(I)にルシフェラーゼを働かせると発光し、このとき(I)はオキシルシフェリン-A(II)とオキシルシフェリン-B(III)に変る。一方(I)をアンモニア-酸素で処理すると発光はしなくなり生成物は(II)と(III)の混合物である。ここに得られた(II)と(III)は下記の反応で関係づけ得た。この関係づけから、(III)は(II)のニ



デスグアニルオキシルシフェリン-B(IV) (後述)

次的生成物と推定される。実際(I)をルシフェラーゼで処理した直後はほとんどが(II)であるが、徐々に(III)の含量が増すことからこの考えが支持されると思われるが確証は得ていない。

ここに得られた(III)は(I)および(II)に比べると酸素、酸、アルカリに対して安定であり、取り扱いが簡単であるのでまず(III)の構造について研究を進めた。

(III)は塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩がいずれも黄色針状晶として得られ、分析値は表1の通りである。

表 1

HCl塩		HBr塩		HNO ₃ 塩	
C	48.62	C	37.83	C	43.47
H	6.19	H	5.28	H	4.63
N	24.34	N	19.50	N	28.74
O	1.83 [Ⓢ]	O	5.71(差) [Ⓢ]	O	23.16(差)
Cl	18.06	Br	31.68		
C ₁₆ H ₁₉ N ₇ ·2HCl·½H ₂ O		C ₁₆ H ₁₉ N ₇ ·2HBr·2H ₂ O		C ₁₆ H ₁₉ N ₇ ·2HNO ₃	
C	49.11	C	37.88	C	44.13
H	5.67	H	4.97	H	4.86
N	25.06	N	19.33	N	28.95
O	2.04	O	6.31	O	22.05
Cl	18.12	Br	31.51		

Ⓢ: HCl塩, HBr塩のO含量は結晶水(結晶水定量)

表1の分析値からは(Ⅲ)の分子式はC₁₆H₁₉N₇·2HCl(2HBr, 2HNO₃)が妥当である。更にこれは(Ⅲ)を水酸化バリウム処理して得られる, デスグアニルオキシリシリン-B(Ⅳ)のマススペクトルM⁺267, C₁₅H₁₇N₅によって支持される(後述)。

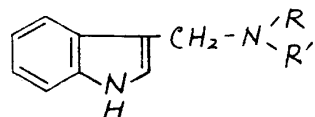
(Ⅲ)は坂口反応陽性であるからN7個のうち3個はグアニジノ基によるものと考えられ、これは(Ⅲ)の加水分解で高収率でアルギニンが得られることから支持される。更にこのグアニジノ基は坂口反応陽性であるから一置換であると推定されるがこれは次の実験から更に明らかになる。(Ⅲ)を約14%水酸化バリウム中100℃で加熱するとほとんど定量的にデスグアニルオキシリシリン-B(Ⅳ)に変る。(Ⅳ)は澄白色、白色針状晶を呈し、そのUV吸収は(Ⅲ)と全く一致し、またNMRスペクトルもほとんど一致する。(Ⅳ)の分子式はマススペクトルよりC₁₅H₁₇N₅であることがわかり(後述)、したがって(Ⅲ)から(Ⅳ)への変化ではCH₂N₂の減少がみられる。これはアルギニン誘導体によく知られているように、一置換グアニジノ基の一級アミノ基へ変化したとして説明できる。この間の事情は表2に示したpKa値から更に明らかになる。即ち(Ⅲ)の11以上のpKa値はグアニジノ基によるものと考えられるが、これは(Ⅳ)では9.6に下り、しかもモルモル滴定で6.45に変化したことは(Ⅲ)の一置換グアニジノ基が(Ⅳ)では一級アミノ基になったことのみ説明可能である。更に(Ⅲ)から(Ⅳ)への変化でUV吸収は全く変化とともなわなかつたことから、このグアニジノ基は発色系に関与して居ないことがわかる。

残る4個の窒素原子のうち2個の性質については次の実験により明らかとなる。

表 2

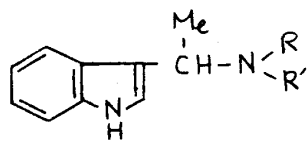
	H ₂ O 中	50% EtOH 中	ホルモール 滴定
(II)	3.3 11以上	2.9 11以上	—
(VI)	—	~2.4 9.6	~2.4(?) 6.45

た。(III)を白金触媒で接触還元すると高収率で、坂口反応陽性、Ehrlich 反応陰性のヒドロキシルシスリン-B(V)が得られる。この化合物はトリプタミン様UV吸収を示すが、溶液の濃性を変化させたときの吸収を細かく比較すると(V)のUV吸収はトリプタミンあるいはトリプトファン系ではなくグラミン系に属することがわかった。典型的なグラミンの吸収は $\lambda_{\max}^{\text{CH}_2\text{OH}-\text{HCl}}$ 213, 269, 286 μ 、 $\lambda_{\max}^{\text{CH}_2\text{OH}-\text{NH}_4\text{OH}}$ 218, 279, 288 μ であり、(V)の吸収もこれと全く一致する。このpHによる吸収位置の変化はモデル化合物として合成した化合物(VI)~(XIII)のすべてに認められる。しかしながらインドール β -位にCH₂OH基または-CH(OH)-基をもつ化合物については全く認められず、したがってこの変化はインドール β -位に1位にN原子の結合した側鎖をもつ化合物の特徴とみさせ、簡単にトリプタミン、トリプトファン系化合物とグラミン系化合物とを区別する方法となりうる。



(VI) R=R'=Me グラミン

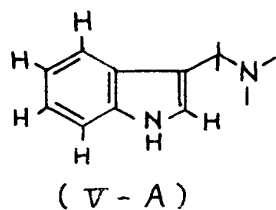
(VII) R=H, R'=Me

(VIII) R=H, R'=CH₂CH₂NH₂(IX) R=H, R'=CH₂CH₂CH₂NH₂(X) R=H, R'=CH₂CH₂OH(XI) R=H, R'=NH₂(?)

(XII) R=H, R'=Me

(XIII) R=H, R'=NH₂(?)

更にグラミン系に特有な性質は、トリプタミン、トリプトファンなど β -位に置換基をもたないインドール誘導体はEhrlich 反応が陽性であるが、グラミンおよびモデル化合物(VII)~(XIII)はすべて陰性であった。(V)は明らかにEhrlich 反応陰性である。以上の事実は(V)が(V-A)の部分構造をもつことを示す。これは後述のマススペクトルからも支持される。更に(V)をアルカリ溶液中加熱するとインドールが得られるが、これは逆マンニッヒ反応が起きたとして(V-A)式で都合よく説明できる。この(V)のインドール部分は(III)および(IV)ではそのUV吸収に(V)の吸収は認められず、

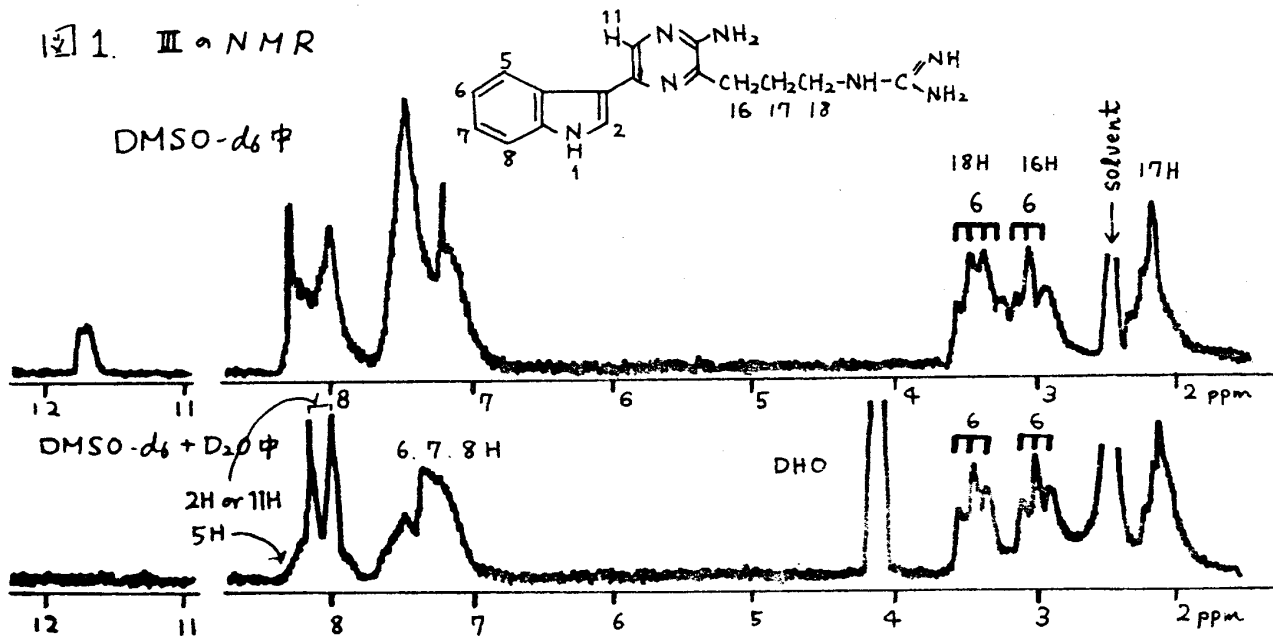


したがって(III)および(IV)では(V-A)或はいずれかの方向に共役していなければならぬ。

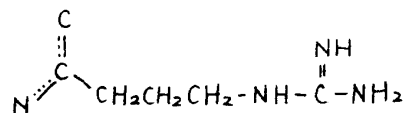
(III)および(IV)は酸に安定で、6NHClまたは6NHBrと115°Cに10数時間保つてもほとんど原料を回収する。しかし冷時亜硝酸を作用させると直ちに反応し、このときβ-ナフトール類を作用させるとカップリング反応を起し橙色を呈する。(III)または(IV)をジアゾ化後、直ちに約50°Cに保つと(III)または(IV)のUV吸収は消失し、新たにUV吸収を示す化合物(XIV)が得られる((III)または(IV) $\lambda_{max}^{CH_3OH-HCl}$ 219, 303, 410 μ , $\lambda_{max}^{CH_3OH-NH_4OH}$ 225, 271, 363 μ ; (XIV) $\lambda_{max}^{CH_3OH-HCl}$ 220, 270 (ph) μ , $\lambda_{max}^{CH_3OH-NaOH}$ 275 μ)。 (XIV)を6NHClで加水分解するとグリシンが得られる。以上の事實は(III)および(IV)に芳香族一級アミノ基があることを示す。更に発色系に関係した一級アミノ基の存在は、(III)または(IV)に酸性条件下で、ホルマリン、アセトンなどカルボニル化合物を作用させるとUV吸収に変化が生ずることでも支持される($\lambda_{max}^{MeOH-HCl}$ 223, 270~280 μ , $\lambda_{max}^{CH_3OH-NaOH}$ 227, 270 μ)。

図1に(III)のDMSO-d₆中のNMRスペクトルを示した。(III)には発色系に参与しない置換基=ジノ基があり、ルシ左リンの加水分解でアルギニンがとれることを考えると、2.2, 3.0, 3.4 ppmのそれぞれ2個のプロトンは相当するシグナルは-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(NH₂)=NH部分のメチレンのシグナルと考えられる。

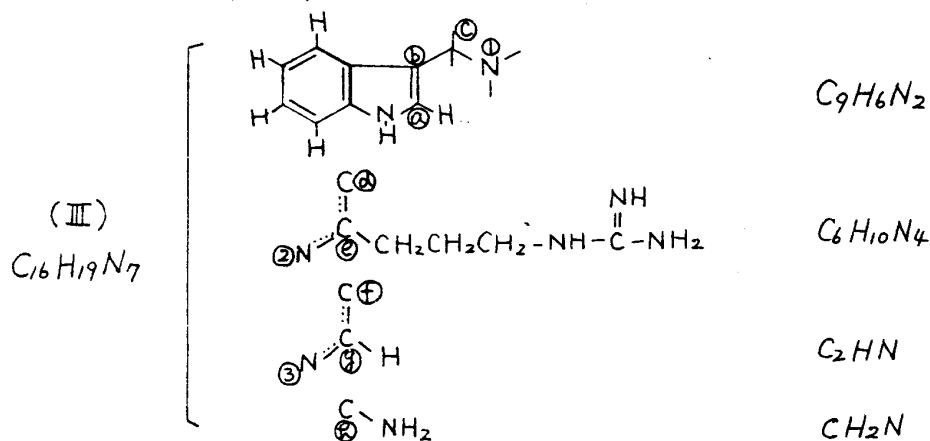
図1. IIIのNMR



これは後述のマスマスペクトルでも支持される。更にこのアルギニン部分のβ位のメチレンのシグナルがトリプレットであるのでα位にプロトンはないと推定され、またそのケミカルシフト(3.0 ppm)がアルギニンに比して約1 ppm低いことから次の部分式が推定される。更にこれはアミノ酸のα位のプロトンに相当するシグナ



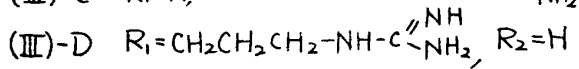
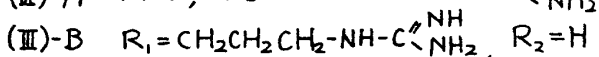
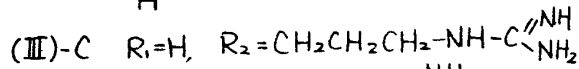
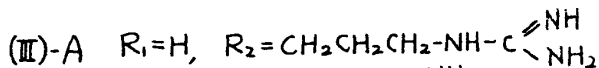
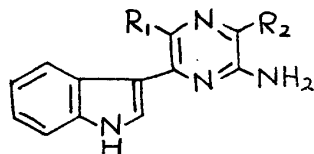
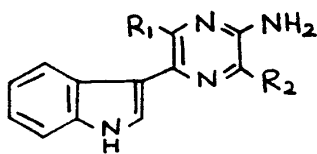
ルがないことから支持される。更に(IV)について得たインドール部分については、インドールのベンゼン核上のプロトン4個がある(7.0~7.8 ppm 3H, 8.2 ppm 1H)。他に重水添加により消失しないシングレット2本がある(8.0 ppm, 8.2 ppm)。ほぼ11.8 ppm近辺の重水添加により消失する中広いシグナルはインドールN-Hと帰属される(モデル化合物もDMSO中では~12 ppm) (XIV)の加水分解でグリシンが得られたが、このグリシンのメチレンに相当するシグナルは(III)のNMRにはなく、したがってグリシン部分は8.0 ppmまたは8.2 ppmのシングレット部分から得られねばならない。したがって(III)の部分式は下の如くなる。



重水素置換されぬ残る1つのシグナル(8.0 or 8.2 ppm)は②, ③, ④, ⑤にし
か結合出来ないが、次の理由で②のみが可能である。③については還元して(IV)で
得た部分構造になりにくい。④については(III), (IV)の発色系を説明するためにはシ
ツフ塩基を伴わねばならず、(III), (IV)が酸に安定なことが説明困難。⑤については
酸化段階が合わず、⑥についても酸化段階が合わずかつシングレットが説明でき
ない。これは後述のマスマスペクトルに $m/e = 142, 130 \sim 127, 118 \sim 113$ などインド
ール核を含むピークから支持される。

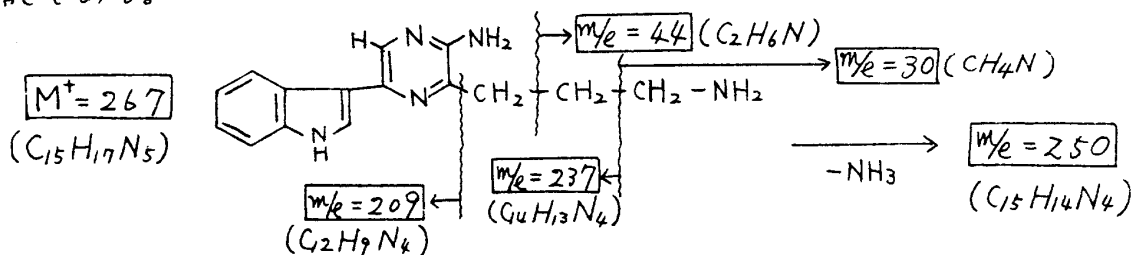
上に得た部分式はN1個, C2個が重複しなければならぬ。

Cの重複の可能性のうち、③=④の可能性はアミジン型となり、pKa値が説明
できないことおよび酸に安定なこと、ジアゾ化の事実が説明困難なため、(III)の構
造としては次の4個しか存在しない。

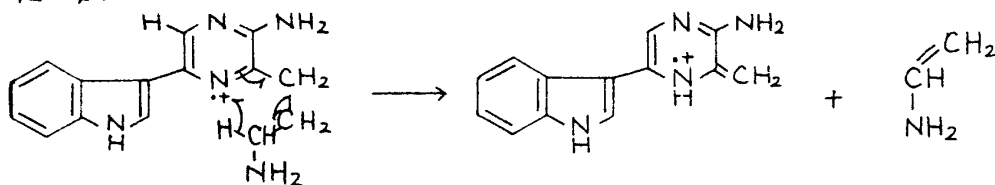


ここに得た(III)A-D式のうち、(III)C, D式は次のことから否定できる。即ちルシ左リンを無水酢酸で処理して得られるアセチルルシ左リン、また塩化ベンゾイル処理で生ずるベンゾイルルシ左リンのUV吸収(波長変化にともなう吸収変化、吸収強度)は(III)とほとんど一致し、これらを加水分解するとルシ左リンに戻る。したがって(III)とルシ左リンとは骨格的にはほとんど変化がないと考えられる。一方ルシ左リンを加水分解するとグリシンとアルギニンがそれぞれほぼ定量的に得られるから(III)C, Dの可能性はない。

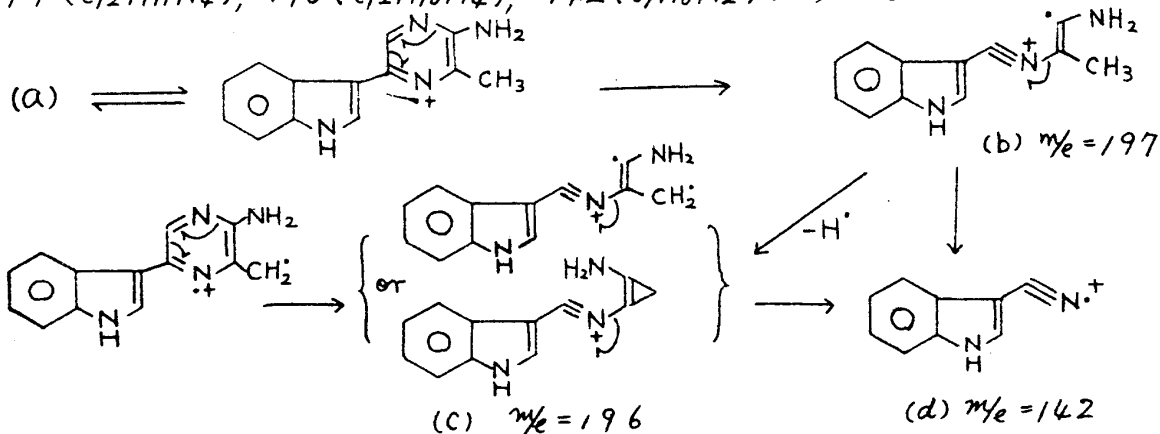
(IV)の高分解マススペクトルは(III)-Aから導かれる(IV)-Aに よってのみ次の如く説明可能である。



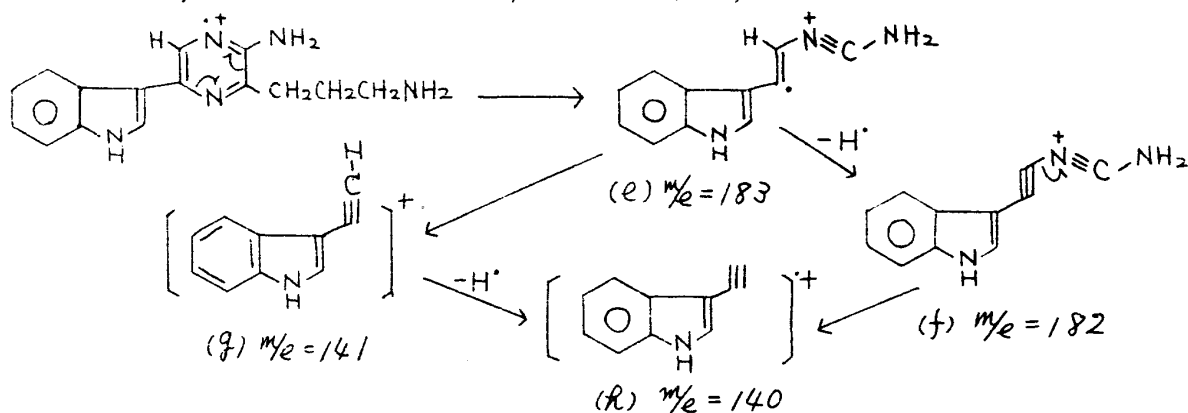
$m/e = 224 (C_{13}H_{12}N_4)$ は



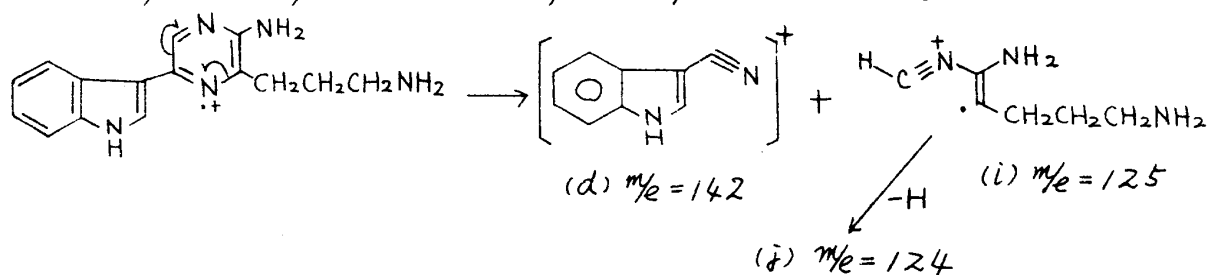
$m/e = 197 (C_{12}H_{11}N_4), 196 (C_{12}H_{10}N_4), 142 (C_9H_6N_2)$ については



$m/e = 183$ ($C_{11}H_9N_3$), 182 ($C_{11}H_8N_3$), 141 ($C_{10}H_7N_1$), 140 ($C_{10}H_6N_1$) について



また $m/e = 125$ ($C_6H_{11}N_3$), 124 ($C_6H_{10}N_3$), 142 ($C_9H_6N_2$) について



更に $m/e = 130 \sim 127$ ($C_9H_8 \sim 5N_1$) はインドール核に C 1 個つゝたかそれに相当するフラグメント, $m/e = 118 \sim 113$ ($C_8H_8 \sim 3N$) はインドール核かそれに相当するフラグメントとして説明される。

ここで(IV)Bは $m/e = 183, 182$, あるいは $141, 140$ 以上はアルキル側鎖 ($CH_2CH_2CH_2NH_2$ 或はその一部) を持つピークがないこと否定できる。

(III)-A式にしたがって NMR の帰属を図 1 に示した。また(III)の低い方の pK_a 値は 2-アミノピラジン核によると考えられ, これは文献値 $3.14^{(6)}$ によく一致する。

最後にマスマスペクトル測定をお願いした日本電子株式会社, また NMR 測定, 元素分析をお願いした塩野義製薬株式会社に深く感謝します。

文献

- 1) E. N. Harvey "Bioluminescence", Academic Press Inc. Publishers, New York p. 299 (1952).
- 2) W. D. McElroy, J. Biol. Chem., 191, 547 (1951).
- 3) O. Shimomura, T. Goto, Y. Hirata, Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 929 (1957).
- 4) Y. Hirata, O. Shimomura, S. Eguchi, Tetrahedron Letters, 1959, no. 5, p 4.
下村, 日化誌 81, 179, 182 (1960).
- 5) 江口, 日化誌 84, 86 (1963).
- 6) A. Albert et al., J. Chem. Soc., 1948, 2240